

# VALIDASI METODE ANALISIS KLORFENIRAMIN MALEAT DAN GUAIFENESIN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI SERTA APLIKASINYA DALAM SEDIAAN SIRUP

Aqnes Budiarti<sup>1)</sup>, Ira Afifah<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim Semarang

## INTISARI

Kombinasi klorfeniramin maleat (CTM) dan guaifenesin (GG) digunakan untuk meringankan gejala batuk dan pilek. Kadar CTM dan GG dalam sirup sangat kecil sehingga penetapan kadarnya memerlukan metode yang valid. Tujuan penelitian ini adalah memvalidasi metode penetapan kadar CTM dan GG dan mengaplikasikannya dalam beberapa sediaan sirup di pasaran.

Penetapan kadar CTM dan GG menggunakan KCKT Jasco Lc-Net II/ADC dengan detektor UV-Visible. Fase diam berupa C<sub>18</sub>Li Chospher dan fase gerak adalah campuran asetonitril:metanol:air (15:10:75 v/v), waktu alir 1 mL/menit pada panjang gelombang 270 nm. Validasi metode meliputi akurasi, presisi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas. Metode analisis diaplikasikan terhadap 3 merk sirup dari pabrik yang berbeda.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa validasi metode penetapan kadar CTM dan GG memenuhi persyaratan yaitu: uji presisi menghasilkan %RSD untuk CTM 0,18% dan GG 0,17%; uji akurasi menghasilkan perolehan kembali yang memenuhi persyaratan baik untuk CTM maupun GG pada sirup ketigamerksirup. Selektivitasnya baik; linieritas memenuhi syarat; LOD CTM dan GG masing-masing sebesar 2,40 µg/mL dan 3,07 µg/mL; LOQ CTM dan GG masing-masing sebesar 8,00 µg/mL dan 10,24 µg/mL. Kadar rata-rata CTM dan GG pada ketiga sirup memenuhi persyaratan kadar yang ditetapkan oleh Farmakope Indonesia Edisi V.

**Kata kunci :** validasi, klorfeniramin maleat, guaifenesin, KCKT

## ABSTRACT

*The combination of CTM and GG is often used as an active substances to relieve symptoms of cough and cold. The concentration of CTM and GG in syrup are very low, so that it need validated determination method to ensure therapeutic dose. The purposes of this study were to validate determination method of CTM and GG and to apply the method to some syrups.*

*Determination of CTM and GG in syrup using HPLC Jasco Lc-Net II/ADC equipped with a UV-Visible detector at a wavelength of 270 nm. The stationary phase used was C<sub>18</sub>Li Chospher and the mobile phase used was a mixture of acetonitrile:methanol:water (15:10:75 v/v) with a flow rate of 1 mL/minutes. Validation test was conducted on precision test, accuracy, selectivity, linearity and sensitivity. The method of analysis was applied to syrups from three different factories.*

*The result of this research showed that validation tests of CTM and GG met the requirements, were: % RSD of precision test for CTM was 0.18% and for GG was 0.17%; accuracy test resulted good recovery for CTM and for GG in syrups. Good selectivity; linearity with a correlation coefficient 0.999; LOD for CTM and GG were 2.40 and 3.07 µg/mL; LOQ for CTM and GG were 8.00 µg/mL and 10.24 µg/mL. The level of CTM and GG in syrups were compliance with the requirements by the Indonesian Pharmacopeia Edition V.*

**Keywords:** validation, chlorfeniramin maleat, guaifenesin, HPLC

## PENDAHULUAN

Kadar CTM dalam sediaan sirup sangat kecil yaitu 1mg tiap 5 ml sirup dan kadar GG adalah 50 mg tiap 5 ml sirup sehingga membutuhkan metode analisis

yang tepat untuk menentukan kadar masing-masing obat. Berdasarkan FI edisi V, kadar CTM dapat ditentukan secara kromatografi gas menggunakan helium kering sebagai gas pembawa. Sedangkan GG dapat ditetapkan

kadarnya menggunakan KCKT dengan fase gerak berupa campuran air:asam asetat glasial dengan perbandingan (990:10 v/v), laju alir 1 mL/menit, kolom L1 pada panjang gelombang 276 nm.

CTM memiliki gugus kromofor berupa cincin pirimidin, cincin benzen, dan ikatan  $-C=C-$  yang mengandung elektron pi ( $\pi$ ) terkonjugasi yang dapat mengasorpsi sinar pada panjang gelombang tertentu didaerah UV, sehingga dapat memberikan nilai serapan (Siswando, 1998). GG mempunyai gugus aoksokrom yang menjadikannya bersifat polar sehingga dapat dipisahkan dengan metode KCKT dan memiliki gugus kromofor yang dapat dianalisis oleh detektor UV (Epstein, 2004).

Chaudhary *et al.*, (2015) telah berhasil mengembangkan metode KCKT untuk penetapan kadar GG, CTM dan bromhexin HCl dalam sediaan tablet menggunakan fase gerak asam ortho fosfat:asetonitril (40:60 v/v), fase diam kolom  $C_{18}$  dengan laju alir 1,5 mL/menit dan menggunakan panjang gelombang 254 nm yang bukan merupakan titik isobastiknya.

Kolhal *et al.*, (2014) telah menetapkan kadar GG, CTM, parasetamol, ambroxol dan fenileprin HCl dengan metode KCKT yang diaplikasikan pada sediaan tablet. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril:air (5:5 v/v), fase diam berupa kolom  $C_{18}$  dengan laju alir 1,5 mL/menit dan menggunakan panjang gelombang 228 nm. Penelitian menghasilkan linieritas yang bagus namun waktu retensi lambat.

Nalini *et al.*, (2014) menetapkan kadar kombinasi obat GG, CTM, parasetamol, fenileprin HCl dan bromhexin HCl dengan metode KCKT pada sediaan tablet menggunakan fase gerak metanol:asetonitril (3:2 v/v), fase diam berupa kolom C-8 simetri dengan laju alir 1 mL/menit dan menggunakan panjang gelombang 220 nm. Penelitian menghasilkan parameter validasi yang memenuhi syarat.

Penelitian yang dilakukan Abdulbari and Ihsan (2013) telah berhasil menetapkan kadar CTM, parasetamol, fenilpropanilamin HCl dan kafein pada sediaan tablet menggunakan metode tervalidasi dengan alat KCKT. Fase gerak berupa campuran asetonitril:metanol:air (15:10:75 v/v), fase diam menggunakan

kolom  $C_{18}$  dengan laju alir 1 mL/menit dan panjang gelombang 220 nm.

Berdasarkan latar belakang permasalahan di atas maka peneliti melakukan validasi metode penetapan kadar CTM dan GG dengan metode KCKT meliputi parameter ketelitian, ketepatan, linieritas, selektifitas dan sensitifitas. Metode tervalidasi diaplikasikan dalam sediaan sirup.

## METODE PENELITIAN

### 1. Alat

Seperangkat KCKT (JascoLc-Net II/ADC) yang dilengkapidengandetektor UV-Visible (2070 plus, injektor (PU-2080 plus), kolom  $C_{18}$ LiChospher 100 RP-18 (5 $\mu$ m), syringe (Hamilton), penangasultrasonik (Jeken), membranpenyaringnylon 0,2  $\mu$ m (GVS),timbangananalitik (Ohaus), spektrofotometer UV-Vis (1800 Shimadzu) danmikropipetukuran 50-1000  $\mu$ L (Accumax).

### 2. Bahan

Baku pembanding CTM (Changshu Huagang Pharmaceuticals Co., Ltd), GG (Akash Ganga, Telangana India), sirup A, B dan C yang berasal dari pabrik yang berbeda, metanol pro HPLC (J.T. Baker), asetonitril (Merck) dan aquadestilata (PT. Ikapharmindo).

### 3. Jalannya Penelitian

#### a. Larutan Baku CTM dan GG

CTM dan GG masing-masing ditimbang seksama 100 mg, lalu dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL masing-masing dan dilarutkan dengan aquadest 5 mL, kemudian ditambahkan aquadest sampai garis tanda batas sehingga diperoleh dua larutan CTM dan GG dengan konsentrasi masing-masing 1000  $\mu$ g/mL.

#### b. Penentuan Panjang Gelombang Untuk Analisis

Larutan CTM dan GG masing-masing 20  $\mu$ g/mL dalam aquadest *discan* menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 200-400 nm. Selanjutnya ditentukan panjang gelombang maksimal berupa titik isobastik. Menurut FI Edisi V, panjang gelombang CTM pada 265 nm dan GG pada 276 nm.

**c. Optimasi Komposisi Fase Gerak**

Optimasi fase gerak terdiri dari campuran asetonitril: metanol: air dengan perbandingan 15:10:75; 10:10:80 dan 5:10:85 v/v. Selanjutnya dipilih fase gerak yang memberikan data terbaik. Laju alir yang digunakan adalah 1 mL/menit.

**d. Kurva Baku CTM dan GG**

Larutan CTM dan GG dengan konsentrasi 20, 40, 80, 100, 120 µg/mL disuntikkan ke dalam sistem KCKT dengan volume 20 µL pada kondisi optimum. Konsentrasi larutan *versus* luas area kromatogram dibuat kurva baku dan dihitung persamaan regresi liniernya. Replikasi 3 kali dan persamaan regresi linier terpilih adalah yang memiliki nilai korelasi (r) terbesar.

**e. Validasi**

**1) Uji Presisi**

Larutan yang mengandung CTM dan GG 100 µg/mL diinjeksikan ke alat KCKT lalu dihitung luas area, waktu retensi dan tinggi puncak kromatogram. Percobaan direplikasi 6 kali lalu dihitung persentase koefisien variasinya.

**2) Uji Akurasi**

Metode penambahan baku (*standard addition method*) melalui uji perolehan kembali pada sampel yang ditambah baku dengan konsentrasi meliputi 80, 100 dan 120%. Replikasi 3 kali.

**3) Uji Selektivitas**

Berdasarkan kromatogram ditentukan nilai resolusi puncak analit CTM dan

GG dan komponen lain dalam sirup terpisah sempurna.

**4) Uji Linieritas**

Menggunakan persamaan regresi linier kurva baku.

**5) Uji Sensitivitas**

Meliputi uji batas deteksi (LOD) dan uji batas kuantifikasi (LOQ) menggunakan persamaan garis regresi linier pada uji linieritas.

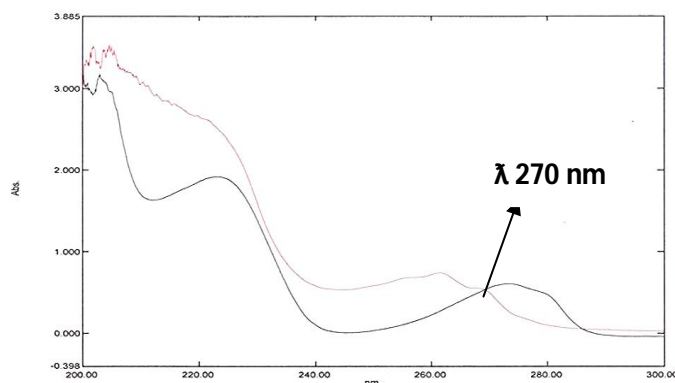
**6) Penetapan Kadar CTM dan GG dalam sirup**

Sampel sirup A dipipet 1000 µL setara dengan 0,20 mg CTM dan 10 mg GG. Sampel dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, dilarutkan dengan fase gerak sampai garis tanda, kemudian larutan disonikasi selama 10 menit. Larutan disaring dengan membrane penyaring *nylon* 0,20 µm kemudian diinjeksikan ke sistem KCKT pada kondisi optimum. Replikasi penetapan kadar 6 kali. Prosedur yang sama juga dilakukan terhadap sampel B dan C

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**1. Penentuan Panjang Gelombang untuk Analisis**

Hasil *scanning* larutan CTM dan GG menghasilkan panjang gelombang maksimal untuk CTM pada 261,50 nm dan GG pada 273,20 nm. Titik isobastik pada 270 nm dan digunakan sebagai panjang gelombang operasional, terlihat pada Gambar 1.

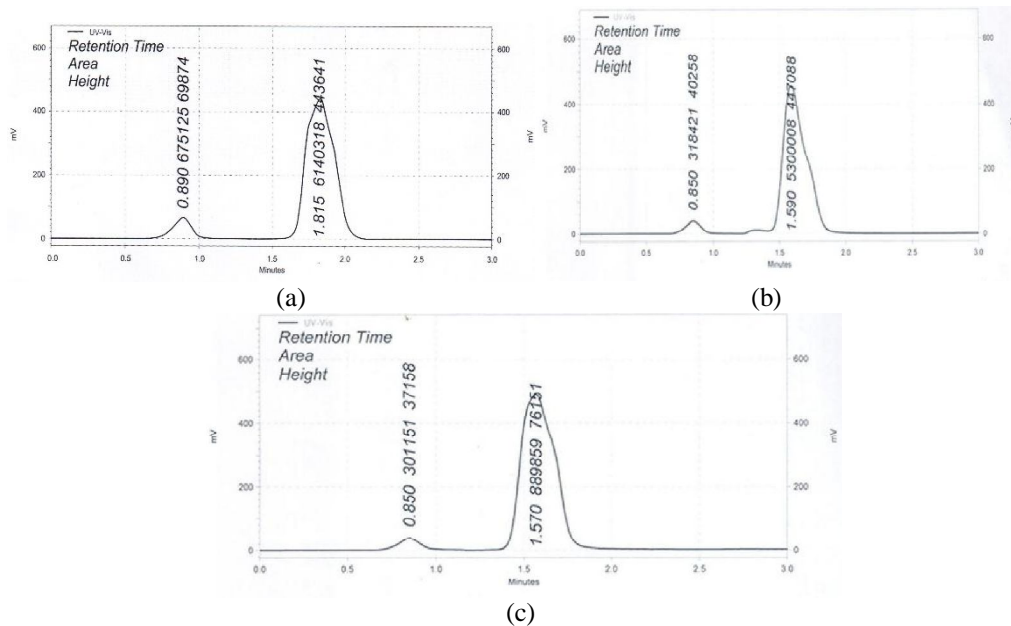


**Gambar 1. Hasil Scanning Penentuan Panjang Gelombang (λ)**

## 2. Optimasi Fase Gerak

Optimasi fase gerak untuk menentukan polaritas fase gerak yang mampu memisahkan zat aktif dengan baik sehingga mampu meningkatkan selektivitas dan sensitivitas metode

analisis. Optimasi fase gerak dengan cara merubah perbandingan fase gerak sehingga mampu ditemukan komposisi fase gerak yang tepat. Hasil optimasi dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2. Kromatogram Hasil Optimasi Komposisi Fase Gerak**

(a) Fase gerak setonitril:metanol:air (5:10:85 v/v)

(b) Fase gerak setonitril:metanol:air (10:10:80 v/v)

(c) Fase gerak setonitril:metanol:air (15:10:75 v/v)

Komposisi fase gerak optimum dipilih berdasarkan parameter waktu retensi dan luas puncak. Dilihat dari waktu retensi, semakin cepat waktu retensi maka semakin cepat waktu analisis yang diperlukan. Sedangkan untuk luas puncak, dipilih luas puncak yang lebih sempit dan lancip (Gandjar dan Rahman, 2007). Fase gerak berupa asetonitril:metanol:air (5:10:85, v/v) menghasilkan kromatogram dengan area yang luas, waktu retensi yang lama dan peak yang dihasilkan simetris. Pada fase gerak berkomposisi asetonitril:metanol:air (10:10:80, v/v), area puncak yang dihasilkan luas, peaknya tidak simetris dan waktu retensinya lama. Waktu retensi yang lama menyebabkan waktu yang dibutuhkan untuk analisis lama, sehingga kedua fase gerak ini tidak dipilih.

Sedangkan fase gerak dengan perbandingan asetonitril:metanol:air (15:10:75, v/v) menghasilkan waktu retensi yang relative cepat, luas puncak relative sempit dan *peak* yang dihasilkan simetris sehingga fase gerak ini dipilih sebagai komposisi fase gerak yang optimum.

## 3. Validasi Metode Analisis

### a. Presisi (ketelitian)

Uji presisi atau keterulangan (*repeatability*) ditentukan berdasarkan nilai RSD (*Relative Standar Deviasi*), waktu retensi, luas puncak dan tinggi puncak kromatogram. Hasil uji yang diperoleh sebesar 0,18 dan 0,17%. Hasil ini memiliki ketelitian yang baik karena semua nilai memenuhi persyaratan. Nilai RSD yang dapat diterima yaitu kurang dari 2% (Harmita, 2004).

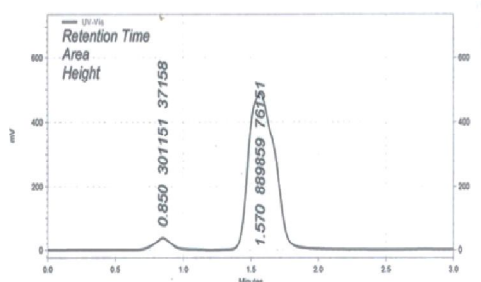
b. Akurasi (ketepatan)

Akurasi menunjukkan kedekatan hasil penetapan kadar dengan kadar yang sebenarnya. Uji ketepatan dilakukan dengan metode penambahan bahan baku (*standard addition method*) dengan sejumlah bahan baku sebesar 80, 100, 120% dari kadar analit target. Nilai perolehan kembali dari uji akurasi CTM dan GG dalam sediaan sirup berada pada rentang nilai yang dapat

diterima yaitu 90 - 107 % (Gonzales *et al.*, 2010).

c. Selektivitas

Selektivitas metode ditentukan berdasarkan nilai resolusinya (R). Semakin besar nilai ini menunjukkan pemisahan komponen-komponen dalam sirup yang terelusi dengan waktu retensi yang berdekatan semakin efisien. Kromatogram CTM dan GG dalam sediaan sirup dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3. Contoh Kromatogram CTM dan GG dalam Sediaan Sirup**

Gambar 3 memperlihatkan tidak adanya komponen lain pada sirup yang ikut terukur. Selain itu pemisahan CTM dan GG menghasilkan nilai  $R = 2,05$  yang memenuhi persyaratan pemisahan yang baik, yaitu  $R \geq 2,00$  (Snyder *et al.*, 1997) Maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis KCKT yang digunakan memiliki selektivitas yang baik dan mampu menganalisis CTM dan GG tanpa gangguan komponen lain dalam sirup.

d. Linearitas

Uji linearitas didasarkan pada hubungan linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram pada pembuatan kurva baku. Persamaan garis regresi linier CTM terbaik berdasarkan besarnya nilai  $r$  adalah  $Y = 5337,18x + 37725,53$  dan GG terbaik berdasarkan besarnya nilai  $r$  adalah  $Y = 22807,73x + 327828,73$  dengan  $r = 0,999$ . Replikasi 3 kali pada pembuatan kurva baku dapat dilihat pada Tabel I.

**Tabe II. Kurva Baku CTM dan GG**

No	Konsentrasi (µg/mL)	Luas Puncak		Persamaan Regresi	
		CTM	GG	CTM	GG
1.	20	141298	762846	a = 41329,13	a = 182126,73
	40	274961	1111825	b = 4923,22	b = 25390,34
	60	303810	1690654	r = 0,988	r = 0,992
	80	413224	2128239		
	100	521977	2915172		
	120	660456	3147969		
2.	20	144101	751427	a = 62903,80	a = 311962,13
	40	253041	1132768	b = 4851,07	b = 21346,40
	60	399029	1621550	r = 0,987	r = 0,999
	80	451123	2009232		
	100	507307	2450588		
	120	660273	2871694		
3.	20	144286	750817	a = 37725,53	a = 327828,60
	40	252812	1194285	b = 5337,18	b = 22807,73
	60	356453	1688917	r = 0,999	r = 0,999
	80	460580	2308266		
	100	578714	2668330		
	120	675125	2935602		

e. Sensitivitas

Sensitivitas metode analisis dinyatakan dengan nilai LOD dan LOQ. Semakin kecil nilai LOD dan LOQ maka semakin sensitif suatu metode analisis (Gandjar dan Rahman, 2007).

Berdasarkan perhitungan dari kurva baku, diperoleh nilai LOD pada CTM dan GG masing-masing yaitu sebesar 2,40 µg/mL dan 8,00 µg/mL. Sedangkan nilai LOQ adalah 3,07 µg/mL dan 10,24 µg/mL.

**4. Penetapan Kadar CTM dan GG**

Kadar rata-rata CTM pada sirup A, B dan C masing-masing sebesar 99,54; 99,30; 99,70% dan GG pada sirup A, B dan C adalah 100,96; 100,91; 101,01%. Hasil yang telah didapat memenuhi persyaratan kadar yang tertera pada Farmakope Indonesia Edisi V, yaitu kadar CTM 98,00%-100,50% dari jumlah yang tertera pada etiket dan kadar GG yaitu 98,00%-102,00% terhitung terhadap zat yang telah dikeringkan.

**KESIMPULAN**

- Validasi metode penetapan kadar CTM dan GG menggunakan metode KCKT dapat dilakukan dengan fase diam C<sub>18</sub> dan fase gerak terdiri dari campuran asetonitril:metanol:air (15:10:75, v/v), laju alir 1 mL/menit pada panjang gelombang 270 nm dan volume injeksi 20 µL.
- Hasil uji validasi metode penetapan kadar CTM dan GG memenuhi persyaratan.
- Metode analisis yang tervalidasi dapat diaplikasikan dalam sediaan sirup dan kadar rata-rata CTM dan GG pada ketigamerksirup memenuhi persyaratan kadar yang ditetapkan Farmakope Indonesia Edisi V.

**DAFTAR PUSTAKA**

Abdulbari and Ihsan., 2013, Simulation Determination and Validation of Chlorfeniramine Maleate, Acetaminophen, Phenylpropanolamine Hydrochloride and Caffeine in Tablet Dosage Form by Using Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), *International Journal of*

- Pharmaceutical Sciences*, Iraq, 666-670.
- Chaudhary Ankit B., Shweta M. Bhadani., Chintal M. Shah., 2015, Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Bromhexine Hydrochloride, Guaifenesin and Chlorfeniramine Maleate in Tablet, *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*, 1679-1694.
- Depkes RI., 2004, *Farmakope Indonesia*, Edisi V, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Epstein, N.A., 2004, Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. *J Pharm Chemistry.*, 222-223.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, Cetakan II, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 378-394, 456-474.
- Gonzales, A.G., Herrador, M.A., and Asuero, A.G., 2010, Intra-Laboratory Assesment of Method Accuracy (Trueness and Precision) by Using Validation Standard, *Talanta*.
- Harmita, 2004, *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*, Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. I, No. 3, 117-135
- Kolhal, Surekha., Rama, Lokhade., Rajiv, Sutar., Sanjay, Pednekar., and Sanket, Gudekar., 2014, RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Paracetaamol, Guaifenesin, Ambroxol, Phenylephrine Hydrochloride, and Chlorfeniramine Maleate in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form, *Int. J. Pharm. Sci*, 105-111.
- Nalini, K., Narmada., Laksmi, G. Vijaya., Gowtham, Y., Jogi, K. V, 2014, Simultaneous Estimation of Paracetamol, Guaiphenesin, Phenylephrine HCl, Chlorpheniramine Maleate and Bromhexine HCl in Combined Tablet Dosage Form by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography, *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, Vol I, No. 2, 410-416.
- Siswandono, 1998, *Prinsip-prinsip Rancangan Obat*, Airlangga University Press, Surabaya, 33-37
- Snyder, R.L., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L., 1997, *Practical HPLC Method Development*, 2nd Edition, John Wiley & Son, Inc., New York, 686-697.